

PCT

ORGANISATION MONDIAL
Bu:



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU I

WO 9603505A1

(51) Classification internationale des brevets 6: C12N 15/29, 1/21, 1/19, C12Q 1/68, A01H 5/00		A1	(43) Date de publication internationale: 8 février 1996 (08.02.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01005		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Date de dépôt international: 26 juillet 1995 (26.07.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/09235 .26 juillet 1994 (26.07.94)		FR	Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GAUTHIER, Marie-Françoise [FR/FR]; 16, rue Cyrano-de-Bergerac, F-34090 Montpellier (FR). LULLIEN-PELLERIN, Valérie [FR/FR]; 79, rue René-Clair, Les Collines d'Estanove, F-34070 Montpellier (FR). DE LAMOTTE, Frédéric [FR/FR]; Les Portes d'Estanove, Bâtiment D, 2500, boulevard Paul-Vaillant, F-34070 Montpellier (FR). JOUDRIER, Philippe [FR/FR]; 60, rue Jeanne-Garnerin, F-34070 Montpellier (FR).			
(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harié & Philip 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).			
(54) Titre: HARD AND SOFT WHEAT THIOREDOXINS h, HOMOLOGOUS PROTEINS, DNA FRAGMENTS CODING FOR SAID PROTEINS AND METHODS FOR PREPARING SAME			
(54) Titre: THIOREDOXINES h DE BLE TENDRE ET DE BLE DUR ET PROTEINES PRÉSENTANT DES SIMILITUTES FRAGMENTS D'ADN CODANT POUR CES PROTEINES ET PROCÉDÉS D'OBTENTION			
<p>Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala</p>			
(57) Abstract			
A protein having at least 65 % sequence homology with the sequence (I). This protein may particularly be hard wheat or soft wheat thioredoxin h. The DNA corresponding to said protein may be integrated into an expression vector for production by microorganisms.			
(57) Abrégé			
Protéine présentant une similitude de séquence d'au moins 65 % avec la séquence (I). Cette protéine peut être en particulier la thioredoxine h de blé dur ou de blé tendre. L'ADN correspondant à cette protéine peut être intégré dans un vecteur d'expression en vue de sa production par des micro-organismes.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LU	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MD	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MG	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	ML	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	MN	Malí	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande		Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

Thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur et protéines présentant des similitudes, fragments d'ADN codant pour ces protéines et procédés d'obtention

La présente invention a pour objet des thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur, des protéines présentant des similitudes ainsi que des fragments d'ADN codant pour ces protéines.

Elle est en outre relative à des procédés d'obtention de ces protéines.

Les thiorédoxines sont des protéines de petites tailles impliquées dans divers processus biologiques et vraisemblablement présentes dans tous les organismes vivants.

Elles interviennent entre autres comme donneurs d'hydrogène pour des réductases (ribonucléotide, méthionine sulfoxyde et sulfate réductase) et comme oxydoréductases des fonctions disulfure de plusieurs protéines. Pour les propriétés générales des thiorédoxines on pourra avantageusement se référer à la revue de Pille (Annales de l'Institut Pasteur, volume 1, 34-50, 1992) ou de Holmgren (TIBS, Janvier 1981, 26-29).

Si les thiorédoxines de bactéries sont bien connues, les thiorédoxines h des organismes supérieurs, et en particulier des plantes ont été assez peu étudiées.

Ainsi, seules les thiorédoxines h de tabac (Marty et Meyer, Plant Molecular Biology, 17, 143-147, 1991; Brugidou et al., Mol Gen Genet, 238, 285-293, 1993), de riz (séquence EMBL N° D 26547), d'Arabidopsis thaliana (Rivera-Madrid et al., Plant

Physiol., 102, 327-328, 1993) et de *Chlamydomonas reinhardtii* (Decottignies et al. Eur. J. Biochem., 198, 505-512, 1991) ont été à ce jour séquencées.

Leur séquençage a été effectué à partir d'ADN complémentaire sélectionné dans des banques d'ADN de tabac ou d'*Arabidopsis thaliana* par hybridation du clone portant l'ADN complémentaire codant pour la thiorédoxine h avec une sonde correspondant à un ADN complémentaire de la thiorédoxine h1 de tabac pour *Arabidopsis thaliana* (Rivera-Madrid et al. précédemment cité), c'est-à-dire une sonde hétérologue, ou après criblage par hybridation différentielle (Marty et Meyer, précédemment cités).

Zhong-Ru Gan (J. Biol. Chem., 1991, 266 (3), 1692-1696) a séquencé une thiorédoxine de levure. Des amorces correspondant à des séquences encadrant le site actif de cette thiorédoxine ont été utilisées pour amplifier un fragment de 34 paires de base. Ce fragment a alors été utilisé comme sonde dans une hybridation du type Southern pour le criblage d'une banque génomique de levure.

Muller et Buchanan (J. Biol. Chem. 1989, 264 (7), 4008-4014) ont quant à eux décrits le clonage d'un gène codant pour une thiorédoxine m, et non une thiorédoxine h. La stratégie utilisée pour le clonage consiste à faire une hybridation du type Southern du génome de la bactérie *Anacystis nidulans*, avec une sonde présentant des similitudes avec les sites actifs d'autres thiorédoxines m puis à cloner le fragment correspondant.

A la connaissance du demandeur, les seules séquences de thiorédoxine h de plantes qui étaient

publiées, et pouvaient donc être utilisées comme sondes, étaient celles de tabac et de *Chlamydomonas reinhardtii*; c'est-à-dire d'une plante dicotylédone et d'une algue unicellulaire.

5 Ces sondes s'hybrident de manière hétérologue avec des ADN complémentaires d'autres plantes présentant une grande distance évolutive, les monocotylédones.

10 Ainsi, l'homme du métier désireux de sélectionner des clones d'ADN complémentaires dans des banques de plantes mono-cotylédones était incité à utiliser des sondes hétérologues, donc peu spécifiques, et ce d'autant plus qu'excepté le site actif, il existe peu de similarité entre les séquences 15 de thiorédoxines h, et induisant ainsi des risques d'erreurs dans la sélection des clones empêchant toute sélection spécifique.

20 Or, les thiorédoxines h interviennent de manière importante chez le blé lors de la germination, et aussi en réduisant de manière spécifique les gluténines et d'autres protéines du grain de blé (Kobrehel et al, 1992, Plant Physiol., 99, 919-924). Afin d'améliorer la qualité de la farine de blé, par exemple l'état d'oxydo-réduction de certaines 25 protéines contenues dans cette farine, on peut modifier l'activité des thiorédoxines h, au niveau génétique, en modifiant les gènes des thiorédoxines h ou en ajoutant de nouvelles copies de ces gènes ou d'ADN complémentaires correspondant à ces gènes.

30 Il peut être aussi envisagé de rajouter des thiorédoxines produites par des microorganismes dans des produits à usage alimentaire, ou de les utiliser pour supprimer l'effet antinutritionnel des

légumineuses ou pour inactiver des toxines, par exemple de venin d'abeilles ou de serpents. Dans tous ces cas, il peut être nécessaire, voire indispensable, d'utiliser des ADN complémentaires correspondant au gène de thiorédoxine h pour produire ces protéines.

L'homme du métier se trouvait donc confronté à une absence de méthode fiable permettant la sélection dans une banque d'ADN complémentaire, de clones codant pour les thiorédoxines h.

Le demandeur s'est donc attaché à rechercher une sonde permettant de sélectionner de manière spécifique et fiable des clones de thiorédoxine h dans une banque d'ADN complémentaire.

Il a montré qu'il était possible d'effectuer une telle sélection en utilisant une sonde codant pour une séquence d'acides aminés composant le site actif des thiorédoxines.

Il a en outre montré que les thiorédoxines h de blés dur et tendre présentent d'une part une grande similitude entre elles, mais d'autre part des grandes différences de structure primaire par rapport aux autres thiorédoxines h de plantes dont les séquences sont déjà connues.

La présente invention a pour objet des protéines présentant une similitude de séquence d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N° 1 suivante:

Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr
Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val
Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg
Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe
Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu
Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro
Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg

Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val
Gly Leu His Ala Ala

Préférentiellement, de telles protéines
présentent une similitude avec la séquence SEQ ID N°1
5 d'au moins 75% et encore plus préférentiellement d'au
moins 85 %.

La présente invention a ainsi pour objet la
thiorédoxine h de blé tendre présentant la séquence
SEQ ID N°3 suivante:

10

Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala
Ala Val Gly Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu
Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala
15 Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys
Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu
Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp
Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val
Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp
20 Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu
Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln

Elle est en outre relative à la thiorédoxine h
de blé dur présentant la séquence SEQ ID N°5 suivante:
Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala
25 Thr Ala Ala Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val
His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala
Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala
Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe
Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu
30 Lys Val Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln
Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys
Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys
Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Ala

Des peptides comprenant au moins un fragment

d'une de ces protéines font aussi partie de la présente invention.

La présente invention a en outre pour objet des fragments d'ADN codant pour une de ces protéines ou un de ces peptides et en particulier un fragment codant pour la thiorédoxine h de blé tendre comprenant la séquence SEQ ID N° 2 suivante:

ATGGCGGCGT CGGCAGCGAC GGCGACGGCG ACGGCGGCGG CGGTAGGGGC
GGGGGAGGTG ATCTCCGTCC ACAGCCTGGA GCAGTGGACC ATGCAGATCG
10 AGGAGGCCAA CGCCGCCAAG AAGCTGGTGG TGATTGACTT CACTGCATCA
TGGTGCAGAC CATGCCCAT TATGGCTCCA ATTTTCGCTG ATCTGCCAA
GAAGTTCCCA GCTGCTGTT TCCTCAAGGT CGACGTTGAT GAACTGAAGC
CCATTGCTGA GCAATTCAAGC GTGGAGGCCA TGCCAACCTT CCTGTTCATG
AAGGAAGGAG ATGTCAAGGA CAGGGTTGTC GGAGCTATCA AGGAGGAAC
15 GACGACCAAG GTTGGGCTAC ACGCGGCCA GTAA

et un fragment codant pour la thiorédoxine de blé dur comprenant la séquence SEQ ID N° 4 suivante :

ATGGCGGCGG CGGCAGCGC GACGACTACA GCGGCGGCCA CGGCAGGCC
GGTGGGCGG GGGGAGGTGA TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA
20 TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA AGCTGGTGGT GATTGACTTC
ACTGCATCAT GGTGCAGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA TTTTTGCTGA
TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC
CTGTTCATGA AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCG GAGCTATCAA
25 GGAGGAGCTG ACGACCAAGG TTGGGCTCCA CGCGCTGCC TAG

Elle a aussi pour objet une méthode de sélection dans une banque d'ADN complémentaire de clones codant pour une thiorédoxine h caractérisée en ce qu'on hybride lesdits clones avec une sonde présentant une similitude de séquences proche de 100% avec le site actif des thiorédoxines.

Avantageusement, une telle sonde présente la séquence suivante : (SEQ ID N° 6)

TGGTG₁X₂GGX₃CCX₄TGX₅AAX₆ATG

dans laquelle :

X₁ représente C ou T

X₂ représente T ou A

5 X₃ représente A, G, C ou T

X₄ représente C ou T

X₅ représente G ou A

On remarquera, comme le montrent les comparaisons effectuées dans les exemples qui suivent 10 , que les thiorédoxines h de blé présentent une grande différence de structure primaire par rapport aux thiorédoxines h de plantes déjà connues.

Il n'était donc en rien évident pour l'homme du métier de déduire les séquences de ces thiorédoxines h 15 de blé des séquences d'autres thiorédoxines h divulguées dans l'état de la technique.

En outre, l'obtention d'ADN complémentaires (ADNc) pour un gène donné n'est pas, malgré les développements récents dans les techniques de biologie 20 moléculaire, une technique de routine.

En effet, l'obtention d'un ADNc particulier nécessite la mise au point d'un procédé spécifique qui va bien au-delà d'une simple adaptation d'une technique. En particulier le choix du matériel dont 25 sont extraits les ARN messagers est essentiel. Cette spécificité est d'autant renforcée que les ARN messagers sont en faibles quantités ce qui est le cas de la présente invention.

On notera de plus que l'utilisation 30 d'oligonucléotides dégénérés pour cribler les ADN complémentaires n'avait jamais été mise en oeuvre dans le cas des thiorédoxines h . Il n'était en rien évident qu'une telle utilisation permette un criblage

efficace.

Le blé est une graminée d'un poids économique considérable et son amélioration, ainsi que celle de ses produits en utilisant les thiorédoxines h ou des 5 fragments d'ADN codant pour ces protéines, constituent des progrès techniques importants.

La présente invention est de plus relative à des vecteurs d'expression portant un fragment d'ADN tel que défini ci-dessus, et en particulier portant au 10 moins une partie de la séquence SEQ ID N°2 ou de la séquence SEQ ID N°4 décrites ci-dessus.

De tels vecteurs comprennent au moins :

- une origine de réPLICATION adaptée à l'espèce biologique, microorganisme ou autre, dans laquelle on souhaite reproduire le vecteur;
- un promoteur situé en amont du fragment d'ADN , adapté à l'espèce biologique dans laquelle on souhaite exprimer les protéines selon l'invention.

Ils peuvent aussi comprendre des séquences de 20 régulation de l'expression du promoteur. Ce promoteur peut être soumis à régulation selon les conditions de culture des microorganismes.

De tels vecteurs peuvent être particulièrement des vecteurs de sécrétion, ou d'excrétion.

25 De manière avantageuse, les fragments d'ADN définis ci-dessus sont intégrés dans un plasmide, et en particulier dans le plasmide pET commercialisé par Novagen (USA).

Des vecteurs pETtrxA et pFL6ltrxA portant la 30 séquence identifiée ci-dessus SEQ ID N°2 ont été déposés respectivement sous les numéros I-1442 et I-1443 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM).

D'autres objets de la présente invention sont des microorganismes, des cellules eucaryotes, et en particulier des cellules végétales ou animales, et des plantes transgéniques portant une des séquences 5 définies ci-dessus. Un tel microorganisme est avantageusement une bactérie, telle que *E. coli* ou une corynèbactérie, une levure ou un champignon filamenteux. Des cellules animales peuvent être, par exemple, des cellules d'insectes.

10 Les espèces biologiques portant ces fragments et/ou vecteurs sont choisies afin de permettre une expression des protéines selon l'invention.

Enfin, la présente invention est relative à un procédé de production des protéines selon l'invention, 15 et en particulier de thiorédoxines h, comprenant les étapes suivantes :

- culture d'un microorganisme tel que défini ci-dessus, et

20 - isolement des protéines ou peptides selon l'invention produits par ledit microorganisme.

Le présent procédé n'est pas limité à l'obtention de dérivés de thiorédoxines h de blé. Il peut aussi être appliqué à la production de thiorédoxines h d'autres céréales telles que le maïs, 25 l'orge, le seigle, le sorgho ou le riz, de légumineuses telles que le soja, l'haricot ou le pois ou d'oléagineux tels que le tournesol, le chanvre, le lin ou le colza, ou de dérivés de ces thiorédoxines h, 30 à l'aide de vecteurs portant des séquences codant pour ces protéines.

Avantageusement, les microorganismes sont lysés après culture et les protéines selon l'invention sont récupérées par des méthodes connues de l'homme du

métier.

L'homme du métier pourra se référer, si nécessaire, pour la préparation des protéines selon l'invention, de leurs vecteurs ou de microorganismes portant ces vecteurs, et de manière générale pour la mise en oeuvre de la présente invention au manuel suivant : Maniatis et al. Molecular cloning : A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory 1982 ou à une de ses récentes rééditions.

Les protéines objets de la présente invention ou pouvant être obtenues selon un procédé objet de la présente invention peuvent être utilisées dans de nombreuses applications, en particulier, comme additifs dans des produits à usage alimentaire ou non alimentaire, pour la suppression de l'effet antinutritionnel des légumineuses, pour l'inactivation de diverses toxines en particulier celles de venin d'abeilles et de serpents.

Ces applications et d'autres applications sont répertoriées dans la demande PCT/US 92/08 595 dont le contenu est intégré à la présente demande par référence.

La production de thiorédoxine h de blé dans la levure, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, permet de l'utiliser directement dans les produits alimentaires sous forme de levures enrichies en thiorédoxine h (par induction de l'expression du gène ou par accumulation de la thiorédoxine h dans la levure), sous forme lyophilisée par exemple.

Le fait d'obtenir des thiorédoxines h de blé par le procédé selon l'invention permet de les ajouter à un produit consommé par les humains tout en leur conservant leur caractère naturel.

La présente invention permet en outre d'obtenir de la thiorédoxine h de blé en quantité importante (par rapport à une purification à partir de blé) par exemple à partir de cultures de bactéries ou de levures et d'ajouter cette thiorédoxine h, après purification ou en utilisant des levures enrichies (surexprimant la thiorédoxine h), à des produits céréaliers en vue d'améliorer leur valeur d'utilisation.

Le fait de disposer des séquences codant pour les thiorédoxines h de blés dur ou tendre permet de les modifier par mutagenèse dirigée et d'obtenir des thiorédoxines h dont les propriétés sont modifiées, et en particulier dont l'activité est améliorée par rapport à celle de la thiorédoxine h isolée du blé.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent dans lesquels:

La figure 1 illustre les différences de séquences des thiorédoxines h de blé tendre (THIOBLETA) de blé dur (THIOBLETD), de riz (THIORIZ), d'Arabidopsis (THIOARA), de thiorédoxine h2 de tabac (THIOTABAC2), de thiorédoxine h1 de tabac (THIOTABAC) et de Chlamydomonas reinhardtii (THIOCHLA).

La figure 2 illustre la construction du plasmide pETtrxTa.

Les figures 3 et 4 représentent respectivement un gel de polyacrylamide-SDS après coloration au bleu de Coomassie et un Western-blot effectué avec un anticorps dirigé contre la thiorédoxine h de blé de :

1. lysat de bactéries avant induction,
2. culot des protéines insolubles du lysat après 3h d'induction,

3. culot après chauffage des protéines solubles du lysat,

4. surnageant après chauffage des protéines solubles du lysat,

5 5. comme 2 après 6h d'induction,

6. comme 3 après 6h d'induction,

7. comme 4 après 6h d'induction.

Les figures 5 et 6 représentent schématiquement les plasmides pFL61 et pVT-U 100.

10 EXEMPLE 1: Obtention de clones de thiorédoxine h de blé tendre

1°) Construction de la banque d'ADN complémentaire (ADNc).

15 L'extraction des ARN totaux de graines et la sélection des ARN poly (A)⁺ ont été effectuées comme décrit par Gautier et al. (Plant Mol Biol., 14, 313-322, 1990).

20 5µg d'ARN poly (A)⁺ issus de graines de Triticum aestivum L., variété capitole en cours de maturation (23 jours après floraison) ont été utilisés pour construire une banque d'ADN complémentaire, en utilisant le Système Superscript Plasmid commercialisé par BRL.

25 Les ADN complémentaires présentant une taille supérieure à 500 pb sont ligués au plasmide pSPORT1 commercialisé par BRL coupé par les enzymes NotI-SalI, qui est utilisé pour transformer des cellules d'Escherichia coli DH5 α .

30 2.10⁵ bactéries recombinantes sont obtenues avant amplification de la banque. Environ 3000 recombinants sont étalés et les colonies sont transférées sur une membrane Hybond C (Amersham) selon les instructions du fabricant.

2°) Isolement d'un clone codant pour une thioredoxine h de blé tendre.

La banque d'ADN complémentaire obtenue en 1°) est criblée à l'aide d'un mélange d'oligonucléotides de synthèse présentant la séquence ID N° 6 suivante :
5 TGGTGX₁GGX₂CCX₃TGX₄AAX₅ATG dans laquelle :

X₁ représente C ou T

X₂ représente T ou A

10 X₃ représente A, G, C ou T

X₄ représente C ou T

X₅ représente G ou A

Un mélange contenant ces oligonucléotides synthétiques marqués à leurs extrémités 5' par du gamma-³²P ATP à l'aide de la polynucléotide kinase T4 a été utilisé.

Les filtres ont été préhybridés (16 heures , 20 37°C) et hybridés (4 heures, 37°C) dans une solution comprenant 15% (v/v) de formamide désionisé, SSPE 2 X, 15 solution de Denhardt 5 X, SDS 1 % (poids/volume) et de l'ADN de sperme de saumon dénaturé (200 µg/ml).

25 Les filtres hybridés sont lavés deux fois dans du SSPE 2 X et du SDS 0,1 % (poids/volume) durant 10 minutes à température ambiante; puis deux fois dans du SSPE 0,25 X, et du SDS 0,1 % (poids/volume) durant 30 minutes à 37°C puis une fois dans du SSPE 0,25 X durant 10 minutes à 37°C.

30 Ils sont ensuite exposés à des films sensibles aux rayons X (Fuji) à -70°C avec deux écrans intensifiants.

Un clone, appelé pTaM1338, est isolé et sa séquence est déterminée sur les deux brins en utilisant la trousse de séquençage Taq Dye Deoxy

Terminator Cycle Sequencing kit commercialisé par Applied Biosystems et le séquenceur 370 DNA automatique commercialisé par Applied Biosystems.

La séquence de l'ADN complémentaire du clone 5 pTaM1338 est la suivante :

(SEQ ID N°7)

10	CAAAGTGGCG GTGAGAAAATA AGCCGTGCTT GCCCAGTAGA GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGATGGCGG CGTCGGCGGC GACGGCGACG GCGACGGCGG CGGGCGGTAGG GGCGGGGGAG GTGATCTCCG TCCACAGCCT GGAGCAGTGG ACCATGCAGA TCGAGGGAGGC CAACGCCGCC AAGAAAGCTGG TGGTGATTGA CTTCACTGCA TCATGGTGGC GACCATGCCG CATTATGGCT CCAATTTCG CTGATCTCGC CAAGAACGTT CCAGCTGCTG TTTTCCTCAA GGTCGACGTT 15 GATGAAACTGA AGCCCATTGC TGAGCAATTG AGCGTGGAGG CCATGCCAAC CTTCCCGCTTC ATGAAGGAAAG GAGATGTCAA GGACAGGGTT GTCGGAGCTA TCAAATGGGA ACTGACGACG AAGGTTGGGC TACACGCCGC CCAGTAATCA CCTACGGAG TAGCATTGCG CTAATAAAAA TTGCCGCTCA ACAAGTAGTG CCTCTAAATGG CACCTTATAT CCTGTGTACT GCTTGTACT TGTTGGTTTA 20 TGGATAATGG TGAATCAAGT GTGACTTTAT TCGGTAAATG GTTGATTTTC GTAAGGAGCT GATCGAACATT AGTTGTTCGG CTATAGGCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

L'extrémité 5' de cette séquence comprend une 25 séquence de 63 paires de bases (pb) non codante, suivie d'une phase de lecture ouverte de 381 pb, puis d'une séquence non codante de 215 pb, à l'extrémité 3'.

La phase de lecture ouverte code pour une 30 protéine de 127 acides aminés de séquence SEQ ID N°2.

La masse théorique de la protéine codée par cette phase de lecture ouverte est de 13524D.

EXEMPLE 2:

Obtention de clone de thiorédoxine h de blé dur.

35 1) Construction de la banque d'ADN complémentaire de blé dur.

La banque est obtenue de manière similaire à celle de l'exemple 1 à l'exception du matériel végétal

utilisé qui est Triticum durum Desf. Variété Agathé. Les ARN totaux sont isolés de grains 22 jours après floraison.

5 Les ARN messagers isolés par chromatographie d'affinité sur oligo dT cellulose sont clonés dans le plasmide pUC118 dans le site de clonage PstI.

La souche d'Escherichia coli JM109 est transformée avec les plasmides obtenus.

10 La méthode de fabrication de cette banque d'ADN complémentaire est mise en oeuvre de la manière décrite par Gautier et al. (Plant Molecular Biology, 14, 313-322, 1990) dont la publication est incluse par référence à la présente demande.

15 2. Isolement d'un clone codant pour une thiorédoxine h de blé dur.

Des clones sont criblés comme indiqué dans l'exemple 1 par le même mélange d'oligonucléotides de synthèse (SEQ ID N° 6).

20 Un clone, dénommé pTd14132 est isolé et sa séquence est déterminée comme indiqué dans l'exemple 1.

Ce clone comprend la séquence d'ADN complémentaire de blé dur suivante :

25 SEQ ID N°8

CGTGAGAAAT AAGCGGTGCT TGCCAAGCAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
ATGGCGGCAG CGGCGACGGC GACGACTACA GCAGCGGGCGA CGGCAGCGGC
GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA
30 TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA AGCTGGTGGT GATTGACTTC
ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA TTTTGCTGA
TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC
CTGTTCATGA AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCG GAGCTATCAA

GGAGGAGCTG ACGACCAAGG TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAGTAATCAC
CTAGCGGAGT AGTATTGCC TAAATAAAAT TGCCGCTTGA GAAGTAGTGC
CTCCAATGGC ACCGGATATG CTGTGTACTG CTTGCTTCTT GTGAGTTTAT
GGATGATGGT GAATCAAATG TGACTTTATT CGGTAAATGG TTGATTCAT
5 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

L'extrémité 5' de cette séquence comprend une partie non codante de 50 bp, puis une phase de lecture ouverte de 390 pb puis une partie non codante de 190 pb à son extrémité 3'.

10 La phase de lecture ouverte correspond à une protéine de 130 acides aminés, ayant une masse moléculaire théorique de 13750D.

EXEMPLE 3:
Comparaison des structures primaires des thiorédoxines h de blés dur et tendre et des autres thiorédoxines h divulguées dans l'état de la technique.

20 Les structures primaires des deux protéines correspondant aux clones pTaM1338 et pTd14132 ont été comparées entre elles et aux structures primaires de thiorédoxines h de riz (THIORIZ), de thiorédoxine h d'Arabidopsis (THIOARA) , de thiorédoxine h2 de tabac (THIOTABAC 2), de thiorédoxine h1 de tabac (THIOTABAC) et de thiorédoxine h de Chlamydomonas reinhardtii (THIOCHLA).

25 Les résultats de ces comparaisons sont repris dans la figure 1.

30 Dans cette figure les acides aminés sont représentés par le code à une lettre et (*) représente une position d'acide aminé identique dans les sept protéines, tandis que (.) représente une position d'acide aminé similaire.

Sur une longueur totale de 138 acides aminés, on observe une conservation à l'identique pour 31

acides aminés (22,5 %) et une similarité pour 42 acides aminés (30,4 %).

Il ressort donc clairement de cette figure que les thiorédoxines h de blés montrent une faible identité de séquence avec les autres thiorédoxines h de végétaux déjà séquencés.

De manière surprenante, l'identité de séquence entre d'une part la thiorédoxine h de riz et d'autre part les thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur n'est que de respectivement 54,9% et 55,7 %, alors que ces plantes sont toutes trois des graminées.

EXEMPLE 4:

Production de thiorédoxine h par des bactéries.

1. Sous-clonage de la séquence codant pour la thiorédoxine h de blé tendre dans un vecteur d'expression d'E.coli:

Le DNA plasmidique pTAM1338 contenant la séquence d'ADNc codant pour la thiorédoxine h de blé tendre (*Triticum aestivum*) a été modifié par mutagénèse dirigée pour introduire les sites de restriction NdeI et BamHI respectivement en 5' et 3' de la séquence codant pour la protéine.

Ces sites de restriction ont ensuite servi à introduire la séquence codant pour la thiorédoxine h de blé tendre (*Triticum aestivum*) dans le vecteur d'expression pET3b commercialisé par Novagen (USA) et décrit par Rosenberg et al., (Gene, 56, 125-135, 1987) digéré par les mêmes enzymes.

La figure 2 illustre cette construction.

Le vecteur pET3b est une molécule d'ADN circulaire dérivé de pBR322; il contient les éléments suivants :

- le promoteur du gène 10 reconnu par l'ARN

polymérase T7 (appelé P010) contenu entre les sites de restriction BglII et XbaI,

- la séquence Shine-Dalgarno du gène 10,

5 - un codon d'initiation ATG contenu dans le site unique de restriction NdeI en 5' des premiers codons du gène 10,

- un site de restriction unique BamHI qui permet de cloner une séquence d'un gène étranger dans le vecteur d'expression,

10 - le terminateur de transcription qui suit normalement le gène 10(T0).

Ce vecteur possède le replicon pMB1 (ori) et contient le gène bla qui code pour la résistance à l'ampicilin (ampR).

15 La séquence codant pour la thiorédoxine h de blé tendre incluse entre les sites de restriction NdeI et BamHI qui ont été créés par mutagénèse dirigée est introduite dans le vecteur d'expression digéré par les mêmes enzymes.

20 Le vecteur résultant pETtrxA est utilisé pour transformer des souches d'E. coli.

Les méthodes conventionnelles de clonage ont été utilisées. Elles sont décrites par Maniatis et al. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

25 Le plasmide pETtrxA résultant de la construction a été séquencé comme décrit par Sanger et al. (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467), dans le but de vérifier qu'aucune mutation n'a été introduite dans la séquence de la thiorédoxine h au cours de l'amplification ou du clonage.

30 La séquence codant pour la thiorédoxine h peut aussi être introduite dans le vecteur d'expression

après modification, par mutagénèse dirigée, d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine dans le but de changer ses propriétés. Les méthodes conventionnelles de mutagénèse dirigée sont décrites par Maniatis et al. (1982, précédemment cité).

2. Obtention de bactéries produisant de la thiorédoxine h:

Le vecteur pETtrxA qui contient la séquence codant pour la thiorédoxine h de blé sous contrôle du promoteur reconnu par l'ARN polymérase du bactériophage T7 est utilisé pour transformer des souches d'*E. coli* (Hanahan et al., 1985, Technique for transformation of *E. coli* in "DNA Cloning: A practical Approach" (Glover , D.M.Ed. Vol.1, pp 109-135, IRL Press, Oxford), capables de synthétiser l'ARN polymérase T7. De telles souches sont commercialisées par Novagen (USA) et décrites par Studier et al., (1990, Methods Enzymol. 185, 60-89). Elles peuvent être:

-BL21 (DE3): *ompT hsdS gal* (*lambda cIts857* *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*),

-BL21 (DE3)pLysE: même génotype que BL21 (DE3) excepté le plasmide pLysE qui dérive du plasmide pACYC184 (Chang et al., 1978 , J.Bacteriol. 134-1141) et contient le gène codant pour le lysozyme T7 ainsi que le gène de résistance au chloramphénicol. Le gène codant pour le lysozyme est exprimé à partir du promoteur tet de pACYC184 ce qui signifie que les bactéries qui portent ce plasmide accumulent un taux important de lysozyme.

-BL21 (DE3)pLysS: même génotype que BL21 (DE3)pLysE mais le gène codant pour le lysozyme est inséré dans l'orientation opposée. En conséquence, les

bactéries qui portent ce plasmide accumulent une quantité beaucoup plus faible de lysozyme.

Les bactéries transformées sont multipliées dans le milieu de Luria-Bertani avec les antibiotiques nécessaires, à 30°C.
5

3. Analyse de l'expression de la thiorédoxine h dans les bactéries.

Les bactéries contenant le vecteur pETtrxA sont cultivées jusqu'à une densité optique comprise 10 entre 0,3 et 0,6 à 600 nm, (une fraction aliquote avant induction est conservée pour analyse). L'inducteur de l'expression de l'ARN polymérase T7 (IPTG 0.1 mM) est alors ajouté au milieu de culture pour permettre l'expression de la thiorédoxine h et 15 les bactéries sont collectées par centrifugation après 3 ou 6 h d'induction.

Les bactéries induites sont lysées par les méthodes conventionnelles et le lysat contenant les protéines totales est centrifugé pour séparer la 20 fraction "protéines insolubles" (culot) de celle des "protéines solubles" (surnageant).

Le surnageant qui contient l'activité thiorédoxine h, identifiée par dosage de la réduction 25 de la malate déshydrogénase comparable au témoin extrait de blé, est chauffé à 60°C (5 min.) et centrifugé pour séparer la fraction des protéines thermostables (surnageant) des autres protéines.

Les échantillons des différentes fractions sont traités avec le tampon de charge de Laemlli (Laemlli, 30 1970, Nature, 227, 680-685), chauffé 5 à 10 minutes dans un bain marie bouillant et analysé par gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide.

Une protéine de la taille attendue pour une

thiorédoxine h de blé est présente dans le lysat des protéines totales de bactéries induites et reste soluble même après chauffage à 60°C; le même gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 435P-4354), et incubé avec un anticorps dirigé contre la thiorédoxine h de blé. La protéine, de taille attendue, synthétisée dans le cytoplasme bactérien après induction, réagit avec l'anticorps.

Les figures 3 et 4 représentent respectivement un gel de polyacrylamide-SDS après coloration au bleu de Coomassie et un Western-Blot effectué avec un anticorps dirigé contre la thiorédoxine h de blé, de :

1. lysat de bactéries avant induction,

15 2. culot des protéines insolubles du lysat après 3h d'induction,

3. culot après chauffage des protéines solubles du lysat,

20 4. surnageant après chauffage des protéines solubles du lysat,

5. comme 2 après 6h d'induction,

6. comme 3 après 6h d'induction,

7. comme 4 après 6h d'induction.

4. Purification de la thiorédoxine h de blé.

25 Les conditions de purification utilisées suivent essentiellement le protocole décrit par de Lamotte-Guéry et al., ((1991) Eur. J. Biochem. 196, 287-294). Les bactéries sont récoltées après induction de 4h selon les conditions décrites plus haut et resuspendues dans un tampon 30 mM Tris/HCl pH 7,9 et 1 mM EDTA (tampon A).

Après un cycle de congélation (-20°C)/décongélation les cellules sont lysées avec une

presse de French et le lysat ainsi obtenu est centrifugé à 4°C, 30 minutes à 50 000 g pour récupérer la fraction surnageante qui est ensuite chauffée à 60°C, 5 minutes.

5 Les protéines dénaturées par le traitement à chaud sont centrifugées comme précédemment. Le surnageant contient principalement la thiorédoxine h. Elle peut être purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium (35-80 %) suivie d'une chromatographie 10 d'exclusion (Sephadex G-50) et d'une chromatographie échangeuse d'ions (Q-Hyper D).

15 Cette dernière chromatographie est réalisée avec un gradient de 0 à 200 mM NaCl, la thiorédoxine h de blé produite dans E.coli est élueée à une concentration de 90 mM NaCl. La mesure de l'activité de la thiorédoxine h (mesure de l'activation de la malate déshydrogénase à NADP selon Jacquot et al.((1981), Plant Physiol., 68, 300-304) à chaque étape aide à suivre la purification.

20 EXEMPLE 5 : Production de thiorédoxine h par des levures.

1. Construction de pFL61trxTa:

25 Le fragment correspondant à la séquence codante de pTaM1388 est amplifié en utilisant deux oligonucléotides de synthèse s'hybridant aux régions 15-34 et 482-502 et un site de restriction NotI est ajouté à chaque extrémité.

30 Le fragment résultant est inséré dans le vecteur pFL61 représenté sur la figure 5 (Lacroix, (1992) Plant J.2 (3), 417-422) préalablement linéarisé par NotI.

Le sens d'insertion et la séquence sont contrôlés. Le vecteur résultant est appelé pFL61trxTa.

2. Construction de pVTUtrxTa:

La séquence de l'ADNc codant pour la thiorédoxine h de blé tendre issue de pTaM1338 est isolée après digestion par BamHI et NdeI du plasmide 5 pETtrxTa (plasmide pET portant la séquence codante de pTaM1338) puis insérée dans le vecteur pVTUtrxTa représenté sur la figure 6, (Vernet et al. (1987) Gene 52, 225-233) au niveau du site de clonage Pvu II. Le vecteur résultant est appelé pVTUtrxTa.

10 3. Conditions de purification:

Les levures (souche OL1 et YPH 250) sont transformées par pVTUtrxTa et sont cultivées en milieu liquide à 30°C et en conditions sélectives, permettant le maintien des plasmides dans les cellules jusqu'à 15 une absorbance à 550 nm de 1, puis sont transférées en milieu riche pendant 16 heures.

Ceci permet d'augmenter la biomasse et le faible nombre de divisions ayant lieu pendant cette durée de temps limite les effets de perte de plasmide. 20 Les cellules sont ensuite cassées par passage dans un broyeur à billes ou par incubation dans de l'ammoniaque. Les conditions de purification de la protéine recombinante à partir du lysat cellulaire sont celles décrites par de Lamotte et al. (1991). 25 Eur. J. Biochem. 196, 287-294).

Les deux souches de levures transformées produisent des thiorédoxines h décelables par immunoempreintes.

La souche YPH252 déposée à l'ATCC peut aussi 30 être utilisée.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: Institut National de la Recherche Agronomique
INRA
(B) RUE: 147 rue de l'université
(C) VILLE: Paris
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 75348

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Thiorédoxines h de blé tendre et de blé dur
et protéines présentant des similitudes; fragments d'ADN
codant pour ces protéines et procédés d'obtention

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 109 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Triticum aestivum

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile
1 5 10 15

Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala
20 25 30

Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu
35 40 45

Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu
50 55 60

Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr Phe
65 70 75 80

Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile
 85 90 95

Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala
 100 105

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 384 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: deux
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Triticum aestivum

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..381

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG GCG GCG TCG GCG GCG ACG GCG ACG GCG GCG GCG GTA GGG Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Val Gly	48
1 10 15	

GGC GGG GAG GTG ATC TAC GTC CAC AGC CTG GAG CAG TGG ACC ATG CAG Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln	96
20 25 30	

ATC GAG GAG GCC AAC GCC GGC AAG AAG CTG GTG GTG ATT GAC TTC ACT Ile Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr	144
35 40 45	

GCA TCA TGG TGC GGA CCA TGC CGC ATT ATG GCT CCA ATT TTC GCT GAT Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp	192
50 55 60	

CTC GCC AAG AAG TTC CCA GCT GCT GTT TTC CTC AAG GTC GAC GTT GAT Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp	240
65 70 75 80	

GAA CTG AAG CCC ATT GCT GAG CAA TTC AGC GTG GAG GCC ATG CCA ACC Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr	288
85 90 95	

TTC CTG TTC ATG AAG GAA GGA GAT GTC AAG GAC AGG GTT GTC GGA GCT Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala	336
100 105 110	

ATC AAG GAG GAA CTG ACG ACC AAG GTT GGG CTA CAC GCG GCC CAG
 Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln
 115 120 125

TAA 384

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 127 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln
 20 25 30

Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr
 35 40 45

Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp
 50 55 60

Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp
 65 70 75 80

Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr
 85 90 95

Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala
 100 105 110

Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln
 115 120 125

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 393 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: deux
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Triticum durum

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..390

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATG GCG GCG GCG GCG ACG GCG ACT ACA GCG GCG GCG ACG GCG GCG	48
Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala	
1 5 10 15	
GGC GTG GGG CCG GGG GAG GTG ATC TCC GTC CAC AGC CTG GAG CAG TGG	96
Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp	
20 25 30	
ACC ATG CAG ATC GAG GAG GCC AAC GCC GCC AAG AAG CTG GTG GTG ATT	144
Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile	
35 40 45	
GAC TTC ACT GCA TCA TGG TGC GGA CCA TGC CGC ATC ATG GCT CCA ATT	192
Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile	
50 55 60	
TTT GCT GAT CTC GCC AAG AAG TTC CCA GCT GCT GTT TTC CTC AAG GTC	240
Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val	
65 70 75 80	
GAC GTT GAT GAA CTG AAG CCC ATT GCT GAG CAA TTC AGC GTC GAG GCC	288
Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala	
85 90 95	
ATG CCA ACC TTC CTG TTC ATG AAG GAA GGA GAC GTC AAG GAC AGG GTT	336
Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val	
100 105 110	
GTC GGA GCT ATC AAG GAG GAG CTG ACG ACC AAG GTT GGG CTC CAC GCG	384
Val Gly Ala Ile Lys Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala	
115 120 125	
GCT GCC TAG	393
Ala Ala	
130	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 130 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Met Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala			
1	5	10	15
Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp			
20	25	30	
Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile			
35	40	45	
Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile			
50	55	60	
Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val			
65	70	75	80
Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala			
85	90	95	
Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val			
100	105	110	
Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala			
115	120	125	
Ala Ala			
130			

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 21 bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: un
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: variation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(6, "t")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: variation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(9, "a")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: mutation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(12, "g")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: mutation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(12, "c")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: mutation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(12, "t")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: mutation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(15, "t")
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
- (A) NOM/CLE: mutation
 - (B) EMPLACEMENT: replace(18, "a")

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TGGTGCGGTC CATGCAAGAT G

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 659 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: deux
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Triticum aestivum

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAAAGTGC	GCTGAGAAAATA	ACCCGGTGCTT	GCCCAGTAGA	GAGAGAGAGA	GAGAGAGAGA	60
GAGATGGCG	CGTCGGCG	GACGGCGACG	GCGACGGCGG	CGGCAGGTAGG	GGCGGGGGAG	120
GTGATCTCC	TCCACAGCCT	GGAGCAGTGG	ACCATGCAGA	TCGAGGAGGC	CAACGCCGCC	180
AAGAACGCTGG	TGGTGATTGA	CTTCACTGCA	TCATGGTGCG	GACCATGCCG	CATTATGG	240
CCAATTTCG	CTGATCTCGC	CAAGAAAGTTC	CCAGCTGCTG	TTTCTCAA	GGTCGACG	300
GATGAACTGA	AGCCCATTG	TGAGCAATT	AGCGTGGAGG	CCATGCCAAC	CTTCCTGTT	360
ATGAAGGAAG	GAGATGTCAA	GGACAGGGTT	GTCGGAGCTA	TCAAGGAGGA	ACTGACGACC	420
AAGGTTGGGC	TACACGCC	CCAGTAATCA	CCTACCGGAG	TAGCATTGCG	CTAAATAAAA	480
TTGCCGCTCA	ACAAGTAGTG	CCTCTAATGG	CACCTTATAT	CCTGTGTACT	GCTTGTACT	540
TGTTGGTTA	TGGATAATGG	TGAATCAAGT	GTGACTTTAT	TCGGTAAATG	GTTGATTTC	600
GTAAGGAGCT	GATCGAATT	AGTTGTTCGG	CTATAGGCAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	659

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 630 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: deux
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Triticum durum

31

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CGTGAGAAAT AAGCGGTGCT TGCCAAGCAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG ATGGCGGC GG	60
CGGGCAGCGC GACGACTACA CGCGCGGCCA CGCGCGGCCG GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA	120
TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA	180
AGCTGGTGGT GATTGACTTC ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA	240
TTTTGCTGA TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG	300
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC CTGTTCATGA	360
AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCG GAGCTATCAA GGAGGAGCTG ACGACCAAGG	420
TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAGTAATCAC CTAGCGGAGT AGTATTCCGC TAAATAAAAT	480
TGCCGCTTGA GAAGTAGTGC CTCCAATGGC ACCGGATATG CTGTGTACTG CTTGCTTCTT	540
GTGAGTTTAT GGATGATGGT GAATCAAGTG TGACTTTATT CGGTAAATGG TTGATTTCAT	600
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA	630

REVENDICATIONS

1. Protéine présentant une similitude de séquence d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N° 1 suivante :

5

Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu Glu Gln Trp Thr
Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val
Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg
Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe
10 Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp Val Asp Glu Leu
Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val Glu Ala Met Pro
Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg
Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val
Gly Leu His Ala Ala

15

2. Protéine selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle présente une similitude de séquence avec la séquence SEQ ID N°1 d'au moins 75 % et préférentiellement d'au moins 85 %.

20

3. Thiorédoxine h de blé tendre selon l'une des revendications 1 et 2 présentant la séquence suivante: SEQ ID N°3

25

Met Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala
Ala Val Gly Ala Gly Glu Val Ile Ser Val His Ser Leu
Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala Asn Ala Ala
Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala Ser Trp Cys
Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe Ala Asp Leu
Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu Lys Val Asp
Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln Phe Ser Val
Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys Glu Gly Asp
Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys Glu Glu Leu
Thr Thr Lys Val Gly Leu His Ala Ala Gln

4. Thiorédoxine h de blé dur selon l'une des revendications 1 et 2 présentant la séquence suivante:
SEQ ID N°5

5 Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala
Thr Ala Ala Ala Val Gly Pro Gly Glu Val Ile Ser Val
His Ser Leu Glu Gln Trp Thr Met Gln Ile Glu Glu Ala
Asn Ala Ala Lys Lys Leu Val Val Ile Asp Phe Thr Ala
Ser Trp Cys Gly Pro Cys Arg Ile Met Ala Pro Ile Phe
10 Ala Asp Leu Ala Lys Lys Phe Pro Ala Ala Val Phe Leu
Lys Val Asp Val Asp Glu Leu Lys Pro Ile Ala Glu Gln
Phe Ser Val Glu Ala Met Pro Thr Phe Leu Phe Met Lys
Glu Gly Asp Val Lys Asp Arg Val Val Gly Ala Ile Lys
Glu Glu Leu Thr Thr Lys Val Gly Leu H. Ala Ala Ala

15 5. Peptide comprenant au moins un fragment d'une des protéines selon l'une des revendications 1 et 4.

20 6. Fragment d'ADN codant pour une des protéines selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou un des peptides selon la revendication 5.

25 7. Fragment selon la revendication 6 codant pour la thiorédoxine h de blé tendre, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

SEQ ID N°2

25 ATGGCGGGCGT CGGCAGGGAC GGCAGCGCG ACAGCGGGCG CGGTAGGGGC
GGGGGAGGTG ATCTCCGTCC ACAGCCTGGA GCAGTGGACC ATGCAGATCG
AGGAGGCCAA CGCCGCCAAG AAGCTGGTGG TGATTGACTT CACTGCATCA
TGGTGCGGAC CATGCCGCAT TATGGCTCCA ATTTCGCTG ATCTGCCAA
30 GAAGTTCCCA GCTGCTGTTT TCCTCAAGGT CGACGTTGAT GAACTGAAGC
CCATTGCTGA GCAATTCAAGC GTGGAGGCCA TGCCAACCTT CCTGTCATG
AAGGAAGGAG ATGTCAAGGA CAGGGTTGTC GGAGCTATCA AGGAGGAACT
GACGACCAAG GTTGGGCTAC ACGCGGCCA GTAA

8. Fragment selon la revendication 6 codant pour la thiorédoxine h de blé dur, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

SEQ ID N° 4

5

ATGGCGGCGG CGGCGACGGC GACGACTACA GCGGCAGCGA CGGGCGGCGA CGGGCGGCGC
GGTGGGGCCG GGGGAGGTGA TCTCCGTCCA CAGCCTGGAG CAGTGGACCA
TGCAGATCGA GGAGGCCAAC GCCGCCAAGA AGCTGGTGGT GATTGACTTC
ACTGCATCAT GGTGCGGACC ATGCCGCATC ATGGCTCCAA TTTTGCTGA
10 TCTCGCCAAG AAGTTCCCAG CTGCTGTTT CCTCAAGGTC GACGTTGATG
AACTGAAGCC CATTGCTGAG CAATTCAAGCG TCGAGGCCAT GCCAACCTTC
CTGTTCATGA AGGAAGGAGA CGTCAAGGAC AGGGTTGTCG GAGCTATCAA
GGAGGAGCTG ACGACCAAGG TTGGGCTCCA CGCGGCTGCC TAG

10

15

9. Vecteur nucléotidique portant un fragment d'ADN selon l'une des revendications 6 à 8.

10. Vecteur appelé pETtrxA selon la revendication 9 portant la séquence SEQ ID N°2, déposé auprès de la CNCM sous le n°I-1442.

20

11. Vecteur appelé pFL61trxA selon la revendication 9 portant la séquence SEQ ID N°2, déposé auprès de la CNCM sous le n° I-1443.

12. Microorganisme portant un vecteur selon l'une des revendications 9 à 11.

25

13. Microorganisme selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est une bactérie ou une levure.

30

14. Méthode de sélection dans une banque d'ADN complémentaires de clones codant pour une thiorédoxine h caractérisée en ce que l'on hybride lesdits clones avec une sonde présentant une similitude de séquences proche de 100 % avec le site actif des thiorédoxines.

15. Méthode selon la revendication 14 caractérisée en ce que ladite sonde présente la

séquence suivante :

SEQ ID N°6

TGGTGX₁GGX₂CCX₃TGX₄AAX₅ATG

dans laquelle :

5 X₁ représente C ou T

 X₂ représente T ou A

 X₃ représente A, G, C ou T

 X₄ représente C ou T

 X₅ représente G ou A

10 16. Procédé de production de protéines et de peptides selon l'une des revendications 1 à 5 , et en particulier de thioréodoxines h comprenant les étapes suivantes :

- culture d'un microorganisme selon l'une des revendications 12 et 13 , et

- isolement des protéines ou peptides selon l'une des revendications 1 à 5 produits par ledit microorganisme.

20 17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que les microorganismes sont lysés après culture.

25 18. Plante transgénique caractérisée en ce qu'elle porte un fragment d'ADN selon l'une des revendications 6 à 8.

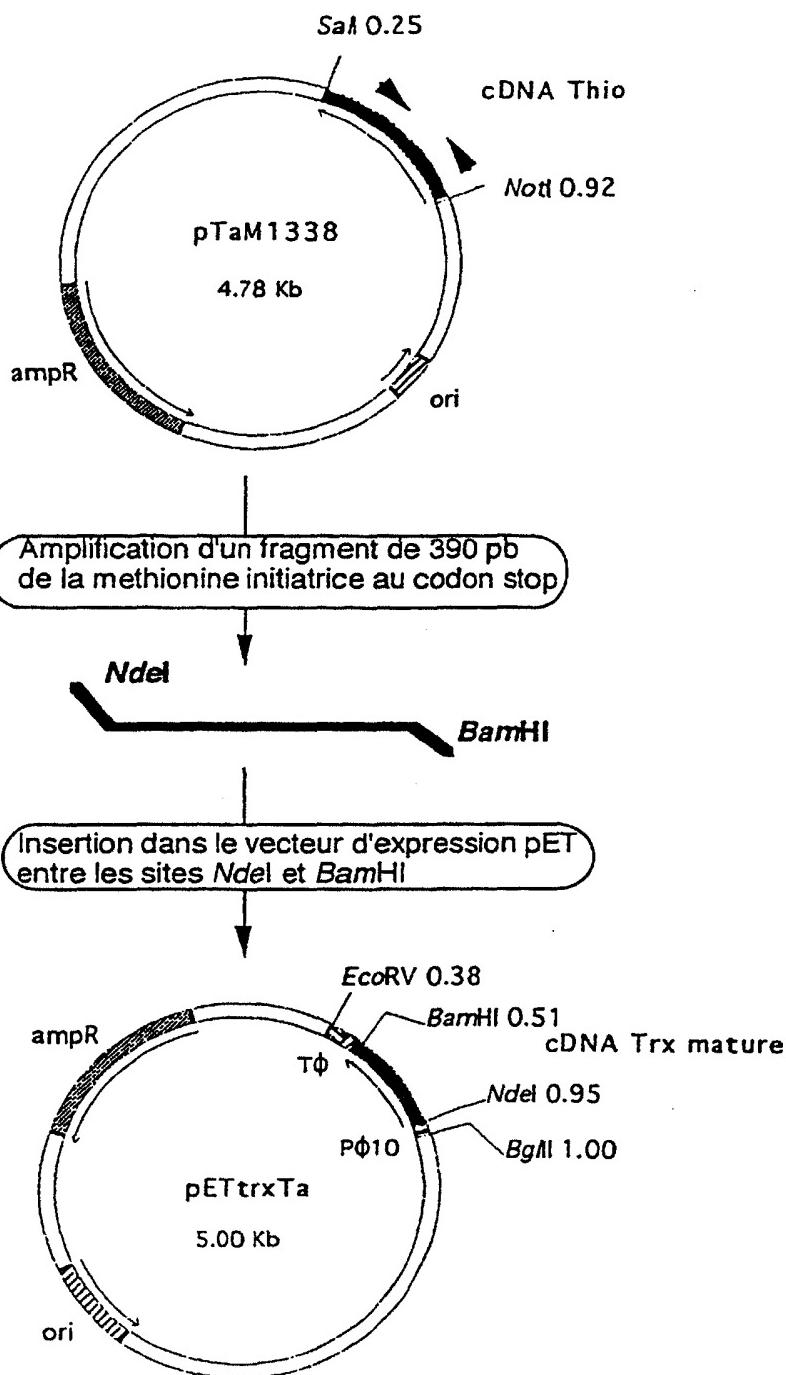
THIOBLETA	MAASAA---TATATAAVGAGEVISVHSLEQWTMQIEEANAAKLUVVIDFTASWC	52
THIOBLETD	MAAAATTTAAATAAVGPGEVISVHSLEQWTMQIEEANAAKLUVVIDFTASWC	55
THIORIZ	MAA-----EE-----GVVIACHNKDEFDAQMKTAKAEAGKVVVIDFTASWC	40
THIOARA	MA-----SEE-----GQVIACHTVETWNEQLQKANESKTLVVVDFTASWC	40
THIOTABAC2	MA-----EE-----GQVIGVHTVDAWNEHLQKGIDDKKLIVVDFDTASWC	39
THIOTABAC	MAANDATSSEE-----GQVFGCHKVEEWNEYFKKGVETKLVVVDFDTASWC	46
THIOCHLA	-----GGSVIVIDSKAAWDAQLAKGKEEHKPIVVDFDTATWC	36

THIOBLETA	GPCRIMAPIFADLAKKFPA-AVFLKVDVDELKPIAEQFSVEAMPTFLFMKEGDVK	106
THIOBLETD	GPCRIMAPIFADLAKKFPA-AVFLKVDVDELKPIAEQFSVEAMPTFLFMKEGDVK	109
THIORIZ	GPCRIFIAPVFAEYAKKFPG-AVFLKVDVDELKEVAEKYNVEAMPTFLFIKDGAEA	94
THIOARA	GPCRIFIAPFFADLAKKLPN-VLFLKVDTDELKSVASDWAIQAMPTFMFLKEGKIL	94
THIOTABAC2	GPKCFIASFYAELAKKMPT-VTFLKVDVDELKSVATDWaveAMPTFMFLKEGKIV	93
THIOTABAC	GPCRIFIAPILADIACKKMPH-VIFLKVDVDELKTVSAEWSVEAMPTFVFIKDGEV	100
THIOCHLA	GPKCMIAPLFETLSNDYAGKVIFLKVDVDAVAEEAAGITAMPFHVYKDGVKA	91

THIOBLETA	DRVVGAIKEELTTKVLHAAQ-----	127
THIOBLETD	DRVVGAIKEELTTKVLHAAA-----	130
THIORIZ	DKVVGARKDDLQNTIVKHVGATAASASA	122
THIOARA	DKVVGAKKDELQQTIAKHL-----A	114
THIOTABAC2	DKVVGAKKDELQQTIAKHSST--S-TA	118
THIOTABAC	DRVVGAKKEELQQTIVKHAAPA--TVTA	126
THIOCHLA	DDLVGASQDKLKLVALVAKHAAA-----	112

FIG. 1

2/5

**FIG - 2**

3/5

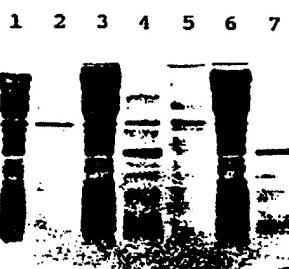


FIG. 3

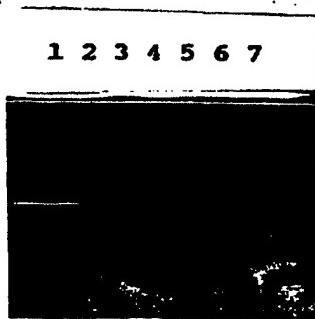


FIG. 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

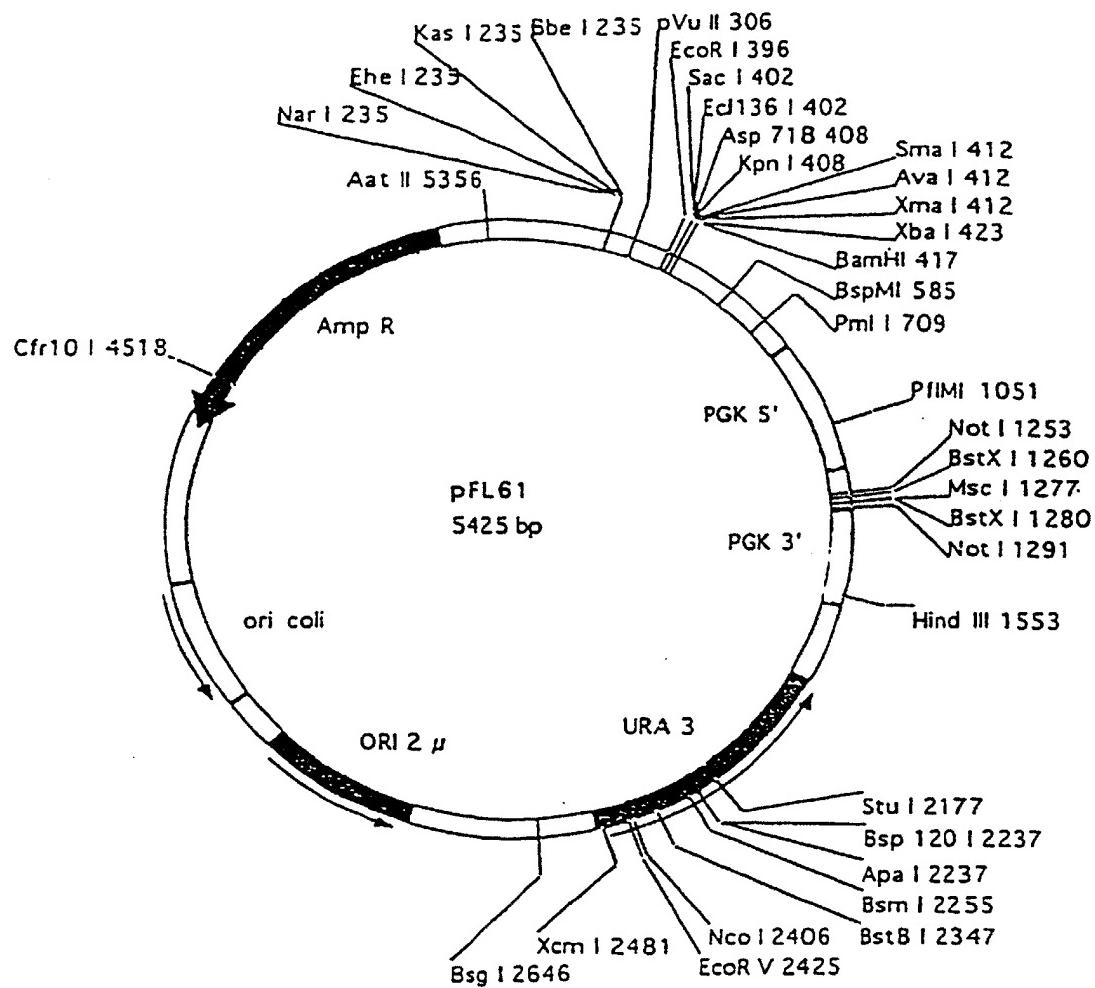


FIG. 5

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

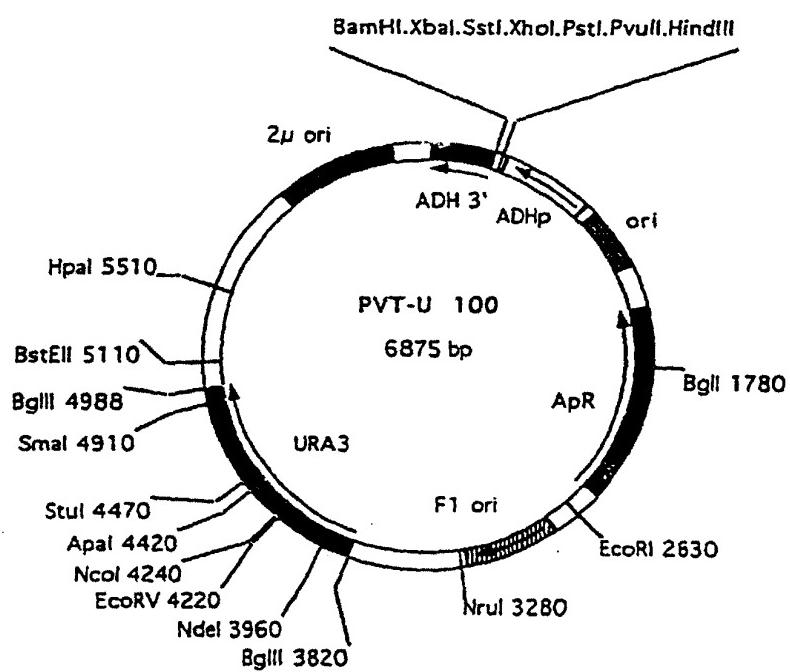


FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No
PCT/FR 95/01005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/29 C12N1/21 C12N1/19 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C12Q A01H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLANT PHYSIOL., vol. 102, pages 327-328, RIVERA-MADRID, R., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an <i>Arabidopsis thaliana</i> thioredoxin h' cited in the application see the whole document ---	1,2,5,6
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 17, pages 143-147, MARTY, I., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA encoding a tobacco thioredoxin' cited in the application see the whole document ---	1,2,5,6

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1995

Date of mailing of the international search report

29.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01005

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 30-11-93 ACC. NO. D21310. Rice mRNA for thioredoxin (gene name SS396), partial cds see sequence ----	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL 40. 23-7-1994. ACC. NO. Z35335. A. thaliana transcribed sequence. Clone TAT6A11 see sequence	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.38. 16-2-1994. ACC. NO. D26547. Rice gene for thioredoxin h, complete cds. see sequence	5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 26-11-1993. ACC. NO. D21836. Rice mRNA for thioredoxin h, complete cds. see sequence	1,2,5,6
X	J. BIOL. CHEM. (1991), 266(3), 1692-6, GAN, ZHONG RU 'Yeast thioredoxin genes' see figure 1 ----	14,15
X	J. BIOL. CHEM. (1989), 264(7), 4008-14, MULLER, ERIC G. D. ET AL 'Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of Anacystis nidulans' see page 4010, left column ----	14
A	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 873, no. 3, pages 415-418, VOGT, K., ET AL. 'Characterization of three different thioredoxins in wheat' see the whole document	1-18
A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994 pages 1021-1022, JARAMILLO, J.L., ET AL. 'Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m' see the whole document	1-18
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 20, 1992 pages 301-306, AGUILAR, F., ET AL. 'Biosynthesis of active spinach-chloroplast thioredoxin f in transformed E. coli' see the whole document	1-18
	----	-/-

Form PCT/ISA/310 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 95/01005

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 08274 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 April 1993 see the whole document ---	1-18
A	PLANT PHYSIOL (BETHESDA) 99 (3). 1992. 919-924., KOBREHEL K ET AL 'SPECIFIC REDUCTION OF WHEAT STORAGE PROTEINS BY THIOREDOXIN H.' cited in the application see the whole document -----	1-18

Form PCT/ISA/310 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational Application No
PCT/FR 95/01005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9308274	29-04-93	AU-A-	2861792	21-05-93
		CA-A-	2121137	29-04-93
		CZ-A-	9400832	16-08-95
		EP-A-	0672127	20-09-95
		HU-A-	69780	28-09-95
		JP-T-	7502887	30-03-95
		ZA-A-	9207831	27-04-93

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demandeur	Intitulé de la demande	Numéro de la demande
PCT/FR 95/01005		

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	CIB 6 C12N15/29	C12N1/21	C12N1/19	C12Q1/68	A01H5/00
----------------------------------------	-----------------	----------	----------	----------	----------

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q A01H C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PLANT PHYSIOL., vol. 102, pages 327-328, RIVERA-MADRID, R., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an Arabidopsis thaliana thioredoxin h' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5,6
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 17, pages 143-147, MARTY, I., ET AL. 'Nucleotide sequence of a cDNA encoding a tobacco thioredoxin' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5,6 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être utilisé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- 'A' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29.12.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01005

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 30-11-93 ACC. NO. D21310. Rice mRNA for thioredoxin (gene name SS396), partial cds voir séquence ---	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL 40. 23-7-1994. ACC. NO. Z35335. A. thaliana transcribed sequence. Clone TAT6A11 voir séquence ---	1,2,5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.38. 16-2-1994. ACC. NO. D26547. Rice gene for thioredoxin h, complete cds. voir séquence ---	5,6
X	EMBL SEQUENCE DATABASE REL.37. 26-11-1993. ACC. NO. D21836. Rice mRNA for thioredoxin h, complete cds. voir séquence ---	1,2,5,6
X	J. BIOL. CHEM. (1991), 266(3), 1692-6, GAN, ZHONG RU 'Yeast thioredoxin genes' voir figure 1 ---	14,15
X	J. BIOL. CHEM. (1989), 264(7), 4008-14, MULLER, ERIC G. D. ET AL 'Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of Anacystis nidulans' voir page 4010, colonne de gauche ---	14
A	BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 873, no. 3, pages 415-418, VOGT, K., ET AL. 'Characterization of three different thioredoxins in wheat' voir le document en entier ---	1-18
A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994 pages 1021-1022, JARAMILLO, J.L., ET AL. 'Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m' voir le document en entier ---	1-18
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 20, 1992 pages 301-306, AGUILAR, F., ET AL. 'Biosynthesis of active spinach-chloroplast thioredoxin f in transformed E. coli' voir le document en entier ---	1-18
		-/-

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01005

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 08274 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 Avril 1993 voir le document en entier ---	1-18
A	PLANT PHYSIOL (BETHESDA) 99 (3). 1992. 919-924., KOBREHEL K ET AL 'SPECIFIC REDUCTION OF WHEAT STORAGE PROTEINS BY THIOREDOXIN H.' cité dans la demande voir le document en entier -----	1-18

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No
PCT/FR 95/01005

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9308274	29-04-93	AU-A- 2861792	21-05-93
		CA-A- 2121137	29-04-93
		CZ-A- 9400832	16-08-95
		EP-A- 0672127	20-09-95
		HU-A- 69780	28-09-95
		JP-T- 7502887	30-03-95
		ZA-A- 9207831	27-04-93

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)